

КАРТИРОВАНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ LYS2 У ДРОЖЖЕЙ-САХАРОМИЦЕТОВ

Ю. О. ЧЕРНОВ, О. В. КИДГОТКО,
О. ДЭМБЭРЭЛИЙН, Д. А. ГОРДЕНИН

Мутанты по гену LYS 2 в отличие от дрожжей дикого типа способны усваивать α -аминоадипиновую кислоту (промежуточный метаболит биосинтеза лизина) в качестве единственного источника азота [14]. Поэтому мутантов *lys 2* можно отбирать селективно на среде с α -аминоадипиновой кислотой. Возможность селекции в обоих направлениях (от дикого фенотипа к мутантному и от мутантного фенотипа к дикому) делают ген LYS 2 удобной экспериментальной моделью для изучения мутационного процесса [8, 10—12, 14], действия гена [15], механизмов рекомбинации [3, 4, 10].

Ген LYS 2 клонирован в лаборатории П. Филиппсена, показано, что кодирующую часть гена составляют около 4 тыс. п. н. [16]. Очевидно, это один из самых больших структурных генов дрожжей. Фермент, кодируемый геном LYS 2, совместно с продуктом гена LYS 5 осуществляет реакцию восстановления α -аминоадипиновой кислоты — один из этапов биосинтеза лизина в клетках дрожжей [14]. Продукт LYS 2, по-видимому, не обладает сложной субъединичной структурой; во всяком случае, межallelльной комплементации в гене LYS 2 не обнаружено [14, 15]. Карта рекомбинации гена LYS2 ранее построена не была.

В настоящей работе мы определили расположение на карте рекомбинации мутаций *lys 2*, полученных в нашей лаборатории. Наиболее надежным из существующих методов внутригенного картирования у дрожжей является метод перекрывающихся делеций [19, 26]. Однако делеции в гене LYS2 возникают редко — в среднем одна делеция на 300 мутаций [10]. Поэтому мы не смогли получить набор перекрывающихся делеций для всей маркированной области гена. Для построения карты LYS2 мы использовали также сравнительный анализ митотической рекомбинации в двухсайтовых и трехсайтовых скрещиваниях. Если мутация локализована между мутациями *a* и *b*, то в гетероаллели *c/a*, *b* (трехсайтовое скрещивание) рекомбинанты дикого типа возникают значительно реже, чем в гетероаллелях *c/a* и *c/b* (двухсайтовые скрещивания) [см. 21]. Этот метод применялся ранее для картирования мутаций в генах HIS4 [18] и ADE2 [6, 7] у дрожжей-сахаромицетов.

Для определения ориентации карты гена LYS2 относительно центromеры хромосомы II мы анализировали гомозиготизацию мутаций *his7* при митотической рекомбинации в гене LYS2. Ген HIS7 локализован в хромосоме II, в 103 сМ от LYS2, дистально по отношению к центromере [см. 24]. Показано, что внутригенная, митотическая рекомбинация может сопровождаться кроссинговером по фланговым маркерам [см. 2]. Если диглоид, гетероаллельный по мутациям *lys 2*, гетероаллельный также по дистальному маркеру *his7*, то рекомбинация мутаций *lys 2* на стадии четырех нитей может сопровождаться гомозиготизацией аллелей HIS7. При этом у рекомбинантов LYS+ может выйти в гомозиготу только аллель гена HIS7, локализованная в одном гомологе с той из двух мутаций *lys 2*, которая расположена ближе к центromере (см. рис. 1). Подробнее сущность этого метода рассмотрено в обзоре [2].

По совокупности данных о рекомбинации между точковыми мутациями и делециями, результатов трехсайтовых скрещиваний и анализа гомозиготизации дистального маркера *his7* мы построили карту реком-

бинации гена *LYS2*. Однако не для всех гетероаллельных сочетаний относительное расположение мутаций было определено однозначно. В некоторых случаях использованные методы не позволяли сделать вывод о локализации мутаций *lys2*.

Материал и методы. В качестве исходного материала были использованы гаплоидные штаммы дрожжей-сахаромицетов Петергофской генетической коллекции: p192-15B-П4 (*a ade2*), 1-ПГ104 (*a his3*), $\alpha'1$ ($\alpha leu2$), $\phi2-\alpha'1$ ($\alpha leu2 rho1$), а также диплоид П3887, полученный при скрещивании штаммов p192-15B-П4 и $\phi2-\alpha1$. Получение и характеристика мутантов *lys2* описаны ранее [8, 10—12]. Мы выделили 21 мутацию *lys2*, которые рекомбинировали между собой во всех попарных сочетаниях. Мы считаем эти мутации точковыми. Мутации, не способные рекомбинировать с двумя и более точковыми мутациями из этого набора, были идентифицированы как делеции. Всего выявлено 10 делеций *lys2*, в том числе 4 делеции, которые не рекомбинировали ни с одной из точковых мутаций, т. е. перекрывали всю маркированную область гена. Список штаммов, маркированных точковыми мутациями и делециями *lys2*, приведен в табл. 1.

Гаплоидные штаммы, несущие мутации *lys2* и *his7*, были получены в мейотическом потомстве гибридов между штаммами, маркированными мутациями *lys2* и штаммами 17Б-П2393 ($\alpha his7$), 7А-П192 (*a ade1 his7 metA1*), 1Г-Д291 (*a ade2 his7*) и 3А-Д233 (*a ade2 his7 rad1*).

Диплоиды, несущие двойные мутации *lys2*, получены в результате митотической рекомбинации между мутациями *lys2* [см. 3, 4, 10]. Гаплоидные штаммы, маркированные двойными мутациями, выделены при анализе диплоидов, гомозиготных по двойным мутациям. Список штаммов, их штаммов *lys2*, приведен в табл. 2.

Условия культивирования описаны в [8]. Условия учета

исходных и гибридных клеток описаны в [8]. Условия учета

исходных и гибридных клеток описаны в [8]. Условия учета

исходных и гибридных клеток описаны в [8]. Условия учета

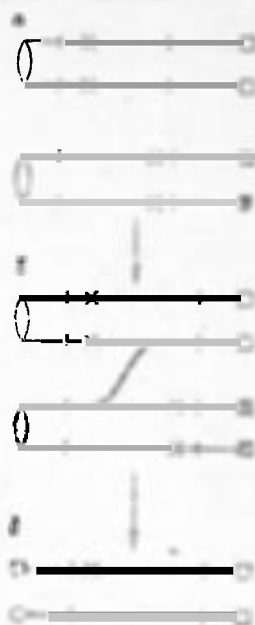


Рис. 1. Гомозиготизация дистального маркера при внутригенной рекомбинации.

Линия соответствует одной хроматиде (двухспиральной молекуле ДНК). X — мутация; □ и ○ — аллели дистального локуса. a — хромосомы гетероаллельного диплоида на стадии четырех нитей; b — возникновение аллели дикого типа при внутригенной рекомбинации, сопровождающейся кроссинговером (выделена хроматида, несущая аллель дикого типа; реципрокный продукт рекомбинации не изображен); a' — гомозиготизация дистального маркера

несущих двойные мутации

Таблица 1. Тестерные штаммы, макированные точковыми мутациями и делециями *lys2*

Мутации	Исходный штамм	Тестерные штаммы *				
		MAT ₁		MAT ₂		
Точковые						
1	a ⁺	6A-П3664	ade2	Л118-а ⁺ 1	leu2	
5		10A-П3658		Л36-а ⁺ 1		
6		6A-П3669		Л48-а ⁺ 1		
7				Л50-а ⁺ 1		
8		4A-П3660		Л6-а ⁺ 1		
		1A-Д291	ade2 his7			
9		1Б-П3661	ade2	Л51-а ⁺ 1		
10		3B-П3662		Л91-а ⁺ 1		
11		1-ПГ104	Л33-1-ПГ104	his3	6Б-П3625	his7
13	Л36-1-ПГ104			1Г-П3626		
14	Л40-1-ПГ104			6Г-П3627		
15	Л42-1-ПГ104			5Г-П3668		
16	Л44-1-ПГ104			2Б-П3669		
17	1-ПГ104			1Б-П3630		
18	Л57-1-ПГ104			5А-П3631		
19	Л59-1-ПГ104			5А-П3632		
20	Л61-1-ПГ104			2Г-П3633		
21	Л68-1-ПГ104			1Б-П3634		
32	p192-15B-П4	Л117-p192-15B-П4	ade2	58-П3876	leu2	
		3А-Д294	his7			
		1А-П5129	ade1 his7			
33		Л208-p192-15B-П4	ade2	17-П3877		
		3Г-П5126	ade1 his7			
42	p192-15B-П4	Л70-p192-15B-П4	ade2	39-П3881	leu2	
76		ЛХ 25-p192-15B-П4		4А-П5121		
				5Б-П5121	ade2	
Делеции						
22	a ⁺	1Б-П3882	ade2	Л167-а ⁺ 1	leu2	
		2-Д 95	ade2 his7			
		3-Д 95				
24		3Г-П3883	ade2	3Б-П3883		
25		2Г-П3886		Л508-а ⁺ 1		
		95	ade2 his7			
		3-Д296				
		9Б-П3884	ade2	Л715-а ⁺ 1		
30		36-П3885		Л729-а ⁺ 1		
37	p192-15B-П4	2Б-П 8 8	ade2	2Г-П3868	leu2	
38		Л40-p192-15B-П4		34-П3871		
75		ЛХ154-p192-15B-П4				
73	П3887-алф7 **			ЛХ407-П3887-алф7		
74		1Б-8Б-1V-9	ade1 ade2	2Б-П5123	leu2	
		2Б-П 130	ade1 his7			

* Приведены все маркеры, кроме *lys2*.

** Сегрегант диплоида П3887, гомозиготный по MAT.

*** Галлоидные штаммы с делецией 73 не получали. Прочерк — тестеры MAT₂ *lys2-7* и MAT₁ *lys2-75* не получали.

после 10 сут. в среде и еще через сутки — на так называемую полу-обогащенную среду, содержащую лизин в концентрации 3 мг/л, т. е. в 10 раз меньше, чем требуется для нормального роста ауксотрофных штаммов. На полуобогащенной среде дрожжи облучали ⁶⁰Co гамма-лучами в дозе 25 Дж/м². Учет результатов проводили через 2-3 сут. в среде. Качественный тест спонтанной мутации проводили аналогично, но без облучения.

Таблица 2. Тестерные штаммы, маркированные двойными мутациями *lys2*.

Исходный гетероаллельный диплоид	Гаплоиды с двойными мутациями	Двойная мутация	Остальные маркеры
П 3920	3А-П3920-5-Р205-Л1 4А-П3920-5-Р205-Л1 1А-П5063 4Г-П5063	22,25	MAT _z leu2 MAT _z leu2 MAT _z ade2 MAT _z ade2
П 5057	3А-П5057-р1-Р7-Л1 3Б-П507-р1-Р7-Л1 1А-П5057-р1-Р26-Л1 1Г-П5057-р1-Р26-Л1	22,33	MAT _z ade2
П 5076	1Г-П5076-р3-ЛР61 2Б-П5076-р3-ЛР61 3Б-П5076-р3-ЛР61	22,32	MAT _z ade2
П 5088	3Г-П5088-р1-ЛР12 4Б-П5088-р1-ЛР12 4Г-П5088-р1-ЛР12	22,74	MAT _z ade2
П 5053	2Б-П5053-1-ЛР67 3Б-П5053-1-ЛР67 4Б-П5053-1-ЛР67 1А-П5053-1-ЛР61 1Б-П5053-1-ЛР71	18,32	MAT _z his3
П 5055	1А-П5055-1-ЛР28 2А-П5055-1-ЛР79 3А-П5055-1-ЛР125	18,42	MAT _z his3
П 5086	1Б-П5086-р1-ЛР39 1Г-П5086-р1-ЛР39 5А-П5086-р1-ЛР39 8А-П5086-р1-ЛР39	8,33	MAT _z ade2
П 5050	1А-П5050-р1-ЛР12 1Б-П5050-р1-ЛР12 4А-П5050-р1-ЛР12	32,33	MAT _z ade2

Для качественной оценки частот митотической рекомбинации применяли также штрих-спот-тест [8]. Гибриды, полученные в результате скрещивания штаммов, маркированных мутациями *lys2*, сеяли параллельными штрихами на полную среду, инкубировали 2—3 сут и переносили методом отпечатков на среду лизина или полубогащенную среду. Для анализа индуцированной рекомбинации дрожжи на среде без лизина облучали УФ в дозе 25 Дж/м². Учет производили через 5—8 дней.

Для получения независимых спонтанных митотических рекомбинантов *Lys*⁺ и количественного учета частоты митотической спонтанной рекомбинации суспензию диплоидного штамма, гетероаллельного по *lys2*, в концентрации около 10⁶ кл./мл высевали на среду без лизина и полубогащенную среду (1 мг лизина·л⁻¹) по 0,1 мл суспензии на чашку. Посев производили с помощью гексагонального репликатора на 151 штырь (см. 9, 13). При этом все отпечатки штырей репликатора находились на одинаковом расстоянии друг от друга. На полубогащенной среде было в 10—100 раз больше колоний *Lys*⁺, чем на минимальной. Частоту спонтанной митотической рекомбинации f_r рассчитывали по формуле $f_r = (n_p - n_s) / 151 = 1/p$, где p — среднее число клеток на отпечатке штыря на полубогащенной среде; n_p и n_s — сред-

нее число колоний на чашке с полуобогатенной средой и со средой без лизина.

Для определения p дрожжи с отпечатков, не содержащих колоний Lys^+ , смывали 1 мл воды и подсчитывали концентрацию клеток в камере Горяева. По результатам 40 подсчетов из различных опытов $p = (1,28 \pm 0,37) \cdot 10^{-4}$ (приведен 95%-ный доверительный интервал).

Для анализа отсевали по одной колонии Lys^+ с отпечатка. Так как большинство клеток Lys^+ возникает уже в ходе остаточных делений на полуобогатенной среде, то таких рекомбинантов можно считать независимыми.

Рекомбинантов Lys^+ , индуцированных УФ, получали по стандартным методикам [5].

В работе использованы стандартные методы вычисления доверительных интервалов и оценки достоверности различий между выборками [1].

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МУТАЦИЙ $lys2$ В ДВУХСАЙТОВЫХ И ТРЕХСАЙТОВЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ

В двухсайтовых скрещиваниях точковых мутаций с делециями мы определили мутации, локализованные в участках, перекрываемых делециями. Одна делеция — $lys2-25$ — не рекомбинирует с двенадцатью точковыми мутациями, две делеции — $lys2-22$ и $lys2-73$ с пятью (причем одними и теми же), три делеции — $lys2-38$, $lys2-74$ и $lys2-75$ — с двумя точковыми мутациями каждая (табл. 3). Четыре точковых

Таблица 3. Рекомбинация между точковыми мутациями и делециями $lys2$.

Делеции	Точковые мутации, перекрываемые делецией	Количество точковых мутаций, перекрываемых делецией
24 29 30 37	все	24
25	1, 5, 11, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 32, 33	12
22 73	6, 10, 13, 18, 42	5
38	13, 18	2
74	16, 19	2
75	6, 13	2

мутации ($lys2-7$, $lys2-8$, $lys2-9$ и $lys2-76$) рекомбинируют со всеми делециями, кроме $lys2-25$, перекрывающих ген $LYS2$.

Крупные делеции $lys2-22$ и $lys2-73$ способны рекомбинировать между собой и, следовательно, не перекрываются. Делеция $lys2-38$ и $lys2-75$ также вступают в рекомбинацию с $lys2-22$, а делеция $lys2-74$ — в рекомбинацию с $lys2-75$.

Для того, чтобы определить расположение мутаций 7, 8, 9 и 76, в табл. 4 приведены мутации мутации, перекрывающиеся с $lys2-22$ и $lys2-73$, но не перекрывающиеся с $lys2-25$. Расположение мутаций 7, 8, 9 и 76 относительно мутаций 22, 25, 73 и 76 показано на рис. 1. Мутации 7, 8, 9 и 76 локализованы в доминантном и репрессивном участках гена $lys2$ (рис. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ митотической рекомбинации в двух- и трехсайтовых скрещиваниях в качественном тесте *

Мутации	9	11	14	10	6	13	16	21	7	30	34	35	36	37	38	16	19	20	1	2
42	+	+	0	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
18	+	+	++	+	+	+	0	±	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
8	+	+	++	+	+	+	±	0	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
11	++	+	++	++	++	+	+	+	+	0	±	+	+	+	+	+	+	++	++	++
14	++	++	++	++	++	+	+	+	+	0	±	+	+	+	+	+	+	++	++	++
33	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
32	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
22	+	±	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	0
25	+	++	+	+	+	+	+	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	++	++	++	++	++	++	++	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22,25	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22,33	±	±	0	0	0	0	0	0	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
22,74	+	±	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32,33	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22,32	+	±	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,32	+	++	++	+	+	±	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,42	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения

для индуцированной рекомбинации:
 ++ более 50 колоний на отпечаток
 + 30—50 колоний
 ± 15—30 колоний
 ± 10—15 колоний

для спонтанной рекомбинации:
 более 40 колоний на отпечаток
 20—40 колоний
 10—20 колоний
 5—10 колоний

0 отсутствие рекомбинации (колоний не больше, чем на отпечатке гомоаллельного диплоида)
 — рекомбинацию не учитывали

* В табл. 4 включены результаты качественного учета рекомбинации во всех проанализированных трехсайтовых скрещиваниях, в контрольных двухсайтовых скрещиваниях, а также во всех двухсайтовых скрещиваниях с участием мутации 11 и 14. Проведен качественный учет рекомбинации и для мутации 11, так как она не содержит дополнительных сайтов. Для мутации 14 данные не приводятся, так как они не содержат дополнительных сайтов. Для мутации 14 данные не приводятся, так как они не содержат дополнительных сайтов. Для мутации 14 данные не приводятся, так как они не содержат дополнительных сайтов.

Мутации 7 и 8 рекомбинируют с двойной делецией lys2-22, 25 значительно реже, чем с одиночными делециями 22 и 25. Рекомбинация мутаций 7 и 8 с двойными мутациями lys2-22, 32, lys2-22, 33 и lys2-22, 74 также снижена. Поэтому мы локализовали мутации 7 и 8 в участке между делециями 22 и 25. При сочетании мутаций 9 и 76 с делецией 22 и двойной делецией 22, 25 образуются рекомбинанты дикого типа с близкой частотой (причем существенно реже, чем в сочетании с делецией 25). Частота рекомбинации мутаций 9 и 76 с остальными двойными мутациями также близка к частоте рекомбинации с соответствующими одиночными мутациями. Поэтому мы локализовали мутации 9 и 76 за пределами участка, перекрываемого двойной делецией lys2-22, 25, причем ближе к делеции 22, чем к делеции 25.

На основании двух- и трехсайтовых скрещиваний с участием мутаций, локализованных в области делеции 22, мы расположили мутации lys2 следующим образом: (9,76)—42—10—6—13—18—(7,8)—делеция 25 (в скобках — мутации, относительное расположение которых не определено). Данные в пользу такого расположения мутаций следующие:

1. Мутация 13 попадает в зону перекрывания делеций 38 и 75, следовательно, находится между 6 и 18 (мутации 6 и 13 локализованы в пределах делеции 75, а мутации 13 и 18 — в пределах делеции 38 — см. табл. 3).

2. Мутации 10, 6 и 13 находятся между 42 и 18, так как частота рекомбинации этих мутаций с двойной мутацией lys2-18, 42 снижена (см. табл. 4).

3. Частота рекомбинации мутаций 42, 10, 6 и 13 с двойной мутацией lys2-18, 32 не снижена по сравнению с рекомбинацией с одиночными мутациями lys2-18 и lys2-32 (см. табл. 4); следовательно, мутации 42, 10, 6 и 13 не расположены в участке между мутациями 18 и 32.

4. Мутация 8 реже рекомбинирует с мутацией 18, чем с остальными мутациями из участка делеции 22 (см. табл. 4).

В области, перекрываемой делецией 25, близко друг к другу локализованы три мутации — 11, 14 и 15, которые рекомбинируют между собой реже, чем с остальными одиночными мутациями lys2 (см. табл. 4). Близкое расположение мутаций 11, 14 и 15 подтверждается и результатами количественного учета спонтанной митотической рекомбинации в двухсайтовых скрещиваниях с их участием (данные не приводятся). Мутации 11, 14 и 15, очевидно, находятся ближе к делеции 22, чем мутации 32, 33 и 74, так как реже рекомбинируют с двойными мутациями lys2-22, 32 и lys2-22, 33 (а мутация 11 — также с lys2-22, 74*), чем с соответствующими одиночными (см. табл. 4).

По результатам качественного теста митотической рекомбинации определить расположение остальных мутаций в области делеции 25 мы не смогли. Частоты спонтанной митотической рекомбинации в двух- и трехсайтовых скрещиваниях с участием этих мутаций, измеренные при упорядоченном посеве на полубогащенную среду, приведены в табл. 5.

Предполагалось, что мутация локализована между a и b, если частота рекомбинации в трехсайтовом скрещивании (c/a, b) снижена по сравнению с частотой в двухсайтовом скрещивании (c/a и c/b). Однако на основании этого критерия установить порядок мутаций 32, 33 и 74 не удалось. Можно лишь сделать вывод, что мутации 33 и 74 находятся ближе

* Рекомбинация мутации 14 и 15 с двойной мутацией lys2-22, 74 не учитывалась.

друг к другу, чем к мутации 32, так как частота рекомбинации в гетероаллели 33/74 на порядок ниже частоты рекомбинации в гетероаллелях 33/32 и 74/32 (см. табл. 5).

Таблица 5. Количественный учет спонтанной митотической рекомбинации в двух- и трехсайтовых скрещиваниях с участием мутаций, расположенных в области, перекрываемой делецией 25.

а	17	21	33	74	20	1	5	32
22	14,6+2,25	8,4+1,56	15,1+6,01	—	28,8±0,80	9,9±2,50	13,6±1,1	9,9±0,87
18	16,2+2,35	14,2+3,01	10,2+2,93	2,8±0,64	—	—	—	—
8	—	4,3+1,87	—	6,2+2,25	—	8,8+2,61	—	9,8+0,32
17	xxx	—	—	6,8+0,14	—	—	—	—
21	—	xxx	—	2,1+0,87	—	—	—	—
33	10,9+4,65	2,3+0,73	xxx	1,0+0,24	11,1±0,75	5,0+0,48	4,4+0,97	16,3+2,32
20	—	—	—	3,7+2,36	xxx	—	—	—
1	—	—	—	1,6±1,31	—	xxx	—	—
32	9,4±1,20	9,45±2,75	12,5±1,38	8,2+2,12	15,0+3,18	4,8±0,74	2,39+0,77	xxx
22,33	3,3±1,11	0,4+0,37	xxx	—	16,5±2,09	1,6+0,61	2,2+0,47	7,7+1,25
8,33	—	4,3+1,87	xxx	0,7+0,32	—	4,0+2,49	—	9,8±2,20
22,74	3,1+1,09	0,5+0,48	0,6+0,30	xxx	2,5±1,39	1,8±0,67	—	4,2+1,45
32,33	9,6+2,64	1,8+0,41	xxx	—	3,5+0,89	0,7±0,50	0,6+0,48	xxx
22,32	7,3+1,49	7,1+1,17	7,6±5,75	—	5,45+0,54	1,6±0,35	1,5+0,43	xxx
18,32	12,5+1,56	8,5±1,40	9,05+2,66	1,2+0,86	—	—	—	xxx

Примечания. Приведены частоты рекомбинантов на 10^6 клеток и 95%-ные доверительные интервалы; «—» — рекомбинацию не учитывали, «xxx» — гомоаллель.

Остальные мутации также не удалось картировать однозначно. Мутации 1 и 5, очевидно, находятся между мутациями 32 и 33, так как частота их рекомбинации с двойной мутацией *lys2-32, 33* резко снижена. Но в то же время мутации 1 и 5 нельзя локализовать ни между 22 и 32, ни между 22 и 33. Для мутации 1 обнаружено снижение частоты рекомбинации в обоих трехсайтовых скрещиваниях (1/22, 32 и 1/22, 33) примерно в три раза по сравнению с наименьшей частотой рекомбинации в соответствующих двухсайтовых скрещиваниях; однако в гетероаллели 1/8, 33 снижения частоты рекомбинации не наблюдается. Для мутации 5 не обнаружено резкого снижения частоты рекомбинации ни в сочетании с *lys2-22, 32*, ни с *lys2-22, 33*. Мутация 21, по-видимому, должна быть картирована ближе к делеции 22, чем мутации 33 и 74, так как частота рекомбинации мутации 21 с двойными мутациями *lys2-22, 33* и *lys2-22, 74* значительно ниже частоты рекомбинации в контрольных двухсайтовых скрещиваниях. Однако частота рекомбинации в гетероаллели 21/8, 33 близка таковой в соответствующих двухсайтовых скрещиваниях. Кроме того, мутацию 21 не удается картировать ни между 22 и 32, ни между 32 и 33. Для мутации 17 в сочетаниях с двойными мутациями *lys2-22, 33* и *lys2-22, 74* наблюдается снижение частоты рекомбинации в два-три раза по сравнению с двухсайтовыми скрещиваниями. Примерно в три раза снижена частота рекомбинации и в сочетаниях мутации 20 с двойными мутациями *lys2-22, 32* и *lys2-32, 33*. Неясно, является ли это достаточным основанием для локализации мутаций 17 и 20.

ГОМОЗИГОТИЗАЦИЯ МУТАЦИИ *his7* ПРИ РЕКОМБИНАЦИИ В ЛОКУСЕ *LYS2*

Мы изучали гомозиготизацию *his7* у рекомбинантов *Lys*⁺ в 8 гетероаллельных комбинациях, полученных с участием семи мутаций *lys2* (четырёх точковых и трех делеций). В результате скрещиваний между

гаплоидными штаммами для каждого из восьми сочетаний мутаций (a/b) были получены диплоиды с реципрокным расположением аллелей генов LYS 2 и HIS 7 (lys2-a his7/lys2-b HIS 7 и lys2-a HIS 7/lys2-b his7). У этих диплоидов отбирали рекомбинантов Lys⁺ как спонтанных, так и индуцированных УФ (доза 100 Дж/м²). Анализировали сегрегацию гетерозиготных маркеров у этих рекомбинантов. Маркеры, не сцепленные с LYS2 (ade1, ade2, his3, leu2), сегрегируют относительно редко: в разных опытах от 0 до 6% рекомбинантов Lys⁺ были гомозиготны по несцепленным рецессивным маркерам; мутация his7, как правило, сегрегирует чаще: в некоторых случаях доля рекомбинантов Lys⁺, гомозиготных по his7, доходила до 20% (табл. 6).

Для пяти из восьми гетероаллельных комбинаций (18/8, 22/25, 22/74, 22/33 и 22/32) относительное расположение мутаций на карте комбинации было установлено ранее. В двух из этих комбинаций (8/18 и 22/25) гибриды с реципрокным расположением аллелей HIS 7 и LYS2 достоверно различались по доле рекомбинантов Lys⁺ (как спонтанных, так и индуцированных УФ), гомозиготных по his7. На основании этих результатов (см. табл. 6) можно заключить, что мутация 18 расположена ближе к центромере, чем мутация 8, а делеция 22 — ближе, чем делеция 25. В обоих случаях ориентация карты гена LYS 2 относительно центромеры хромосомы 2 одинакова: CEN 2—lys2-22—lys2-8—lys2-25—HIS 7. В остальных трех комбинациях (22/74, 22/33 и 22/32) различия между реципрокными гибридами не достоверны.

Обозначим мутации 22 и 18 как lys2-a, а мутации 8 и 25 и мутации, локализованные в области делеции 25, —74, 33 и 32 — как lys 2-b. При сравнении выборки рекомбинантов Lys⁺, полученных у реципрокных гибридов в пяти комбинациях мутаций типа a/b, по критерию Уилкоксона — Манна-Уитни [см. 1] оказалось, что, у гибридов типа lys2-a his7 lys2-b HIS 7 рекомбинанты, гомозиготные по his7, возникают достоверно чаще, чем у гибридов типа lys2-a HIS 7/lys2-b his7 ($P_{\text{H}_0} < 0,01$). Этот результат согласуется с приведенной выше ориентацией карты гена LYS 2 относительно центромеры (а ближе к центромере, чем b).

Относительное расположение мутаций в гетероаллельных комбинациях 33/74, 33/32 и 74/32 не было известно. В двух из этих комбинаций не наблюдалось достоверных различий между реципрокными гибридами по сегрегации his7. В комбинации 74/32 различия были достоверны (см. табл. 6); на основании этого мы заключили, что мутация 74 локализована ближе к центромере, чем мутация 32.

Карта гена LYS 2, построенная по совокупности данных двух- и трехсайтовых скрещиваний и анализа гомозиготизации his7, приведена на рис. 2. Мутация 33 ближе к центромере, чем мутация 32, так как первая находится ближе к делеции 74, чем вторая. Для мутаций 17 и 20 указано предположительное расположение, наиболее соответствующее результатам трехсайтовых скрещиваний. Наиболее удаленное (по сравнению с другими мутациями) от центромеры расположение мутации 32 не противоречит данным трехсайтовых скрещиваний, так как для этой мутации не обнаружено снижения частоты рекомбинации ни в одном из трехсайтовых скрещиваний.

Обсуждение. Количественные методы внутригенного картирования основаны на представлении о том, что частота возникновения рекомбинантов данного типа увеличивается по мере увеличения расстояния между мутациями. Это представление не противоречит конверсионной модели внутригенной митотической рекомбинации [2]. У дрожжей-хармонистов для внутригенного картирования ранее, как правило, использовали анализ частот митотической рекомбинации в двухсайто-

вых скрещиваниях, индуцированной рентгеновыми лучами [22]. Однако К. Мур и Ф. Шерман [23] показали, что частота возникновения прототрофов при мейотической и митотической (как спонтанной, так

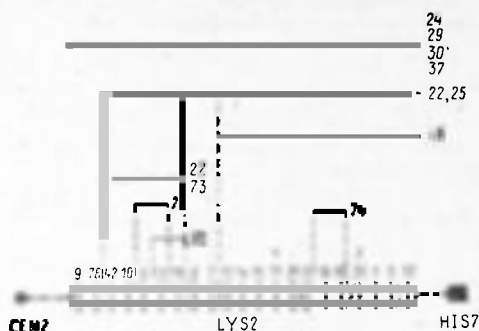


Рис. 2. Карта гена LYS2.

Цифры обозначают номера мутаций. Делеции изображены в виде отрезков, пропорциональных числу перекрываемых ими точковых мутаций. В скобках — участки, внутри которых порядок мутаций не определен. Пояснения в тексте.

и индуцированной) рекомбинации мутаций *cys1* не пропорциональна физическому расстоянию между мутациями, измеренным по аминокислотным заменам в белке. Следовательно, рекомбинационные карты, построенные на основании количественного учета рекомбинации, не всегда соответствуют реальным физическим расстояниям.









Полуколичественный метод трехсайтовых скрещиваний позволяет определить главным образом порядок мутаций, а не расстояние между ними. С помощью этого метода была построена карта рекомбинации гена ADE2 [6, 7]. Однако в некоторых случаях он не позволяет локализовать мутации однозначно [6, 26]. С. Г. Инге-Вечтомов с соавт. считают, что это явление («потусторонний эффект») наблюдается при малом расстоянии между двойной и одиночной мутациями (частоты спонтанной митотической рекомбинации менее $0,5 \cdot 10^{-6}$), и связывают его с конверсионным механизмом внутригенной рекомбинации: двойная мутация может конвертировать к дикому типу реже, чем одиночная, поэтому снижение частоты рекомбинации в трехсайтовом скрещивании с/а, b может иногда наблюдаться и в том случае, когда с не локализована между а и b [6].

В наших экспериментах метод трехсайтовых скрещиваний также не всегда позволял сделать вывод об относительном расположении мутаций и не только при малых расстояниях между ними. Например, в двухсайтовых скрещиваниях с участием мутаций 22, 32 и 33 зарегистрированы частоты спонтанной митотической рекомбинации порядка 10^{-5} (см. табл. 5). Поскольку мутации 33 и 32 находятся в пределах делеции 25, не перекрывающейся с делецией 22 (см. табл. 3), возможно альтернативное расположение этих мутаций: 22—33—32 и 22—32—33. Однако снижение частоты рекомбинации по сравнению с таковой в двухсайтовых скрещиваниях не наблюдается ни в гетероаллели 33/22, 32, ни в гетероаллели 32/22, 33 (см. табл. 4 и 5). Таким образом, по результатам трехсайтовых скрещиваний нельзя расположить ни мутацию 33 между мутациями 22 и 32, ни мутацию 32 между мутациями 22 и 33. Причины подобных парадоксов неясны. Возможно, они связаны с маркер-эффектами мутаций *lys2*.

Достоверные различия по частоте гомозиготизации дистального

маркера *his 7* при рекомбинации в гене *LYS2* между реципрокными гибридами также были зарегистрированы не для всех комбинаций мутаций (см. табл. 6). По данным К. Лоуренс с соавт. [21], анализ гомо-

Таблица 6. Сегрегация мутации *his7* у рекомбинантов *Lys*⁺.

Мутации	Условия	lys2-a his7/lys2-b HIS7			lys2-a HIS7/lys2-b his7			P _n
		Число:		всего	Число:		всего	
		гибри- дов	гомозигот по his7		гибри- дов	гомозигот по his7		
18/8	Спонт. УФ		14 (15,1%) 22 (19,0%)	93 116	1 1	4 (4,6%) 11 (9,9%)	87 111	< 0,05
22/25	Спонт. УФ		13 (6,5%) 39 (19,7%)	197 198	1 2	2 (1,4%) 4 (3,3%)	146 120	< 0,05 < 0,001
22/33	Спонт. УФ		20 (12,0%) 10 (10,5%)	167 95	1 1	10 (9,0%) 13 (9,8%)	111 132	> 0,1
22/74	Спонт. УФ		8 (7,6%) 19 (9,8%)	105 194	1 1	3 (3,8%) 10 (9,4%)	79 106	> 0,1
22/32	Спонт. УФ		19 (9,9%) 21 (11,6%)	192 181	2 2	17 (8,2%) 21 (10,1%)	208 208	> 0,1
33/74	Спонт. УФ		15 (14,2%) 20 (15,4%)	106 130	1 1	6 (7,9%) 20 (13,6%)	76 147	> 0,1
33/32	Спонт. УФ		19 (9,9%) 19 (9,8%)	192 193	1 1	17 (7,8%) 16 (8,2%)	219 194	> 0,1
74/32	Спонт. УФ		20 (18,4%) 11 (8,8%)	109 125	1 1	3 (2,4%) 6 (5,1%)	126 118	< 0,001 > 0,1

Примечание. В графе P_н приведены значения вероятности случайных различий между выборками по доле рекомбинантов, гомозиготных по *his7*.

зиготизации дистального маркера при внутригенной митотической рекомбинации у дрожжей не всегда позволяет определить расположение рекомбинирующих мутаций относительно центромеры. Возможно, эта неоднозначность связана с осуществлением части событий митотической рекомбинации до репликации ДНК [17, 27]. Рекомбинация на стадии двух нитей не приводит к гомозиготизации дистального маркера. На результатах наших экспериментов могло сказаться также большое расстояние между генами *LYS2* и *HIS7*—103 морганиды [22], что увеличивает вероятность совпадения двух и более событий рекомбинации в одной хромосоме.

Ранее некоторые исследователи [см. 2, 20] наблюдали, что УФ сильнее индуцирует митотическую конверсию, чем реципрокную рекомбинацию фланговых маркеров. В наших экспериментах (см. табл. 6) для большинства сочетаний мутаций *lys2* доля гомозигот по дистальному маркеру *his7* среди спонтанных и индуцированных рекомбинантов *Lys*⁺ не различалась. Для гетероаллели 74/32 облучение УФ достоверно снижало долю гомозигот по *his7* среди рекомбинантов, а для гетероаллели 22/25 — наоборот, повышало. Анализ продуктов индуцированной митотической рекомбинации в гене *LYS2* также свидетельствует, что УФ и рентгеновское излучение индуцируют как конверсию, так и реципрокную внутригенную рекомбинацию с близкой эффективностью [4, 10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным двух- и трехсайтовых скрещиваний, а также результатам анализа гомозиготизации дистального маркера *his7* при рекомбинации в гене *LYS2* мы распределили мутации *lys2* по карте рекомбинации и определили ее ориентацию относительно центромеры хромосомы II. Полученный набор точковых мутаций, делеций и двойных мутаций *lys2* может быть использован при изучении структуры и функции гена *LYS2* и механизмов внутригенной рекомбинации. Картирование мутаций *lys2* осложняется тем обстоятельством, что используемые методы не всегда дают однозначно интерпретируемые результаты. Дальнейшую детализацию карты предполагается проводить с помощью набора делеций, генерируемых *in vitro* в клонированном гене *LYS2*.*

* Авторы благодарны профессору С. Г. Инге-Вечтому за полезные советы и замечания, а также Н. Н. Хромову-Борисову и О. И. Белозеровой за предоставленные для обсуждения данные и Ю. И. Павлову за предоставленные штаммы.

Summary

LYS2 point mutations were distributed among few regions of the map according to recombination with a limited set of intragenic deletions. Fine mapping was made on the basis of two- and three-point intragenic crosses. Homozygotization of distal marker *his7* was studied in some two-point crosses to verify the order of mutations determined by other methods and to orient the map on chromosome 2. The resulting map is published. Unmappable situations and their possible molecular mechanisms are discussed.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глотов Н. В., Животовский Л. А., Хованов Н. В., Хромов-Борисов Н. Н. Биометрия. Л., 1982. 264 с.
2. Горденин Д. А., Кваша В. В. Внутригенная рекомбинация и методы построения генных карт у грибов. — В кн.: Исследования по генетике, 1976, вып. 7, с. 73—88.
3. Горденин Д. А., Чернов Ю. О. Новый маркер-эффект внутригенной рекомбинации у дрожжей-сахаромицетов. — Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 3, с. 716—719.
4. Горденин Д. А., Чернов Ю. О., Дэмбэрэлийн О. и др. Изучение внутригенной рекомбинации в локусе *LYS2* у дрожжей-сахаромицетов. — В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. V Всесоюзный симпозиум. Тезисы докладов. М., 1983, с. 139.
5. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Фёдорова И. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1976. 112 с.
6. Инге-Вечтомов С. Г., Горденин Д. А., Кваша В. В. Двойные мутации по локусу *ade2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и их использование для внутригенного картирования. — Генетика, 1975, т. 11, № 4, с. 121—123.
7. Кваша В. В., Горденин Д. А., Инге-Вечтомов С. Г. Распределение некомплементирующих и полярно комплементирующих мутаций в локусе *ade2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — Генетика, 1976, т. 12, № 5, с. 126—138.
8. Павлов Ю. И. Использование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для изучения активности и специфичности мутагенов и промутагенов: Автореф. канд. дис. Л., 1980. 20 с.
9. Хромов-Борисов Н. Н. Метод упорядоченного посева для изучения роста и мутирования микроорганизмов. — Тез. докл. конференции по генетике промышленных микроорганизмов. Цахкадзор, 1973, с. 43.
10. Чернов Ю. О. Рекомбинация точковых мутаций и делеций в гене *LYS2* у дрожжей-сахаромицетов: Автореф. канд. дис., Л., 1984. 16 с.
11. Чернов Ю. О., Горденин Д. А. Мутанты по гену *LYS2* у дрожжей-сахаромицетов. — IV съезд ВОГиС им. Н. И. Вавилова: Тез. докладов. Кишинев, 1982, ч. I, с. 383—384.
12. Чернов Ю. О., Горденин Д. А., Солдатов С. П., Глазер В. М. Изучение мутабельности гена *LYS2* у диплоидов дрожжей-сахаромицетов. Сообщ. I. Возникновение спонтанных мутантов и мутантов, индуцированных рентгеновским и ультрафиолетовым излучением. — Генетика, 1985, т. 21, № 4, с. 564—573.
13. Borstel R. C. von. Measuring spontaneous mutation rates in yeast. — Methods in Cell Biology, 1978, vol. 20, p. 1—24.
14. Chaitoo B. B., Sherman F., Azubalis D. e. a. Selection of *lys2* mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the use of α -amino adipate. — Genetics, 1979, vol. 93, N 1, p. 51—65.

15. Chattoo B. B., Palmer E., Ono B.-I., Sherman F. Patterns of genetic and phenotypic suppression of *lys2* mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* — Genetics, 1979, vol. 93, N 1, p. 67—80.
16. Eibel H., Philippsen P. Identification of the cloned *Saccharomyces cerevisiae* *LYS2* gene by an integrative transformation approach. — Molecular and General Genetics, 1983, vol. 191, N 1, p. 66—73.
17. Fabre F. Induced intragenic recombination in yeast can occur during the G1 mitotic phase. — Nature, vol. 272, p. 795—798, 1978.
18. Fink G. R. A cluster of genes controlling three enzymes in histidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — Genetics, 1966, vol. 53, p. 445—459.
19. Fink G. R., Styles C. A. Gene conversion of deletions in the *HIS4* region of yeast. — Genetics, 1974, vol. 77, p. 231—244.
20. Hurst D. D., Fogel S. Mitotic recombination and heteroallelic repair in *Saccharomyces cerevisiae*. — Genetics, 1965, vol. 50, p. 435—458.
21. Lawrence C. W., Sherman F., Jackson M., Gilmore R. A. Mapping and gene conversion studies with the structural gene for iso-1-cytochrome c in yeast. — Genetics, 1975, vol. 81, N 4, p. 615—629.
22. Manney T. R., Mortimer R. K. Allelic mapping in yeast by X-ray induced mitotic conversion. — Science, 1964, vol. 143, p. 581—583.
23. Moore C. W., Sherman F. Role of DNA sequences in genetic recombination in the iso-1-cytochrome c of yeast. I. Discrepancies between physical distances and genetic distances determined by five mapping procedures. — Genetics, 1975, vol. 79, p. 397—418.
24. Mortimer R. K., Schild D. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*. — Microbiological Reviews, 1980, vol. 44, N 4, p. 519—571.
25. Rose A. H. Growth and handling of yeast. — Methods in Cell Biology, 1975, vol. 12, p. 1—16.
26. Sherman F., Jackson M., Liebman S. W. et al. A deletion map of *cycl* mutants and its correspondence to mutationally altered iso-1-cytochrome c of yeast. — Genetics, 1975, vol. 81, p. 51—73.
27. Wildenberg J. The relation of mitotic recombination to DNA replication in yeast pedigrees. — Genetics, 1970, vol. 66, p. 291—304.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МУТАНТОВ ХЛАМИДОМОНАДЫ, НАКАПЛИВАЮЩИХ ПРОТОПОРФИРИН IX

Е. М. ЧЕКУНОВА, К. В. КВИТКО

В настоящее время усилия многих биологов направлены на создание штаммов-продуцентов биологически активных веществ, используемых в медицине, сельском хозяйстве и промышленности. К таким веществам несомненно относятся порфирины. Порфирины — окрашенные тетрапиррольные соединения; в комплексе с металлами они широко распространены в природе — это гемоглобин, хлорофилл и его предшественники, витамин B_{12} , ферменты: каталазы, пероксидазы, цитохромы. В один класс с порфиринами крови и зеленого листа входят синтетические красители ряда фталоцианинов, применяемые в промышленности.

Протопорфирин IX является общим предшественником гема и хлорофилла. Его металлопроизводные широко используются в органических и фотохимических исследованиях, а также в качестве катализаторов химической промышленности. Таким образом, с одной стороны существует практическая потребность в значительных количествах протопорфирина IX, а с другой — принципиальная возможность получения этого вещества в результате жизнедеятельности различных живых существ. Так, известны мутанты кишечной палочки [12], дрожжей [18] и фотосинтезирующих организмов: водорослей [15, 23] и высших растений [26], накапливающих протопорфирин.

У одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* мутанты, накапливающие протопорфирин, были получены и описаны многими исследователями [20], [6], [15, 23] и [2, 10, 21]. Накопление порфириновых пигментов — результат блока в синтезе хлорофилла.